

Die Ausscheidung von freien
Porter-Silber-Chromogenen im Urin
nach Verabreichung von Progesteron und 9α -
Brom-11-Keto-Progesteron

von

DIETER FRIEDBURG

1961

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule der
Universität München
Direktor: Professor Dr. med. W. Bickenbach

DIE AUSSCHIEDUNG VON FREIEN PORTER-SILBER-CHROMOGENEN
IM URIN NACH VERABREICHUNG VON PROGESTERON UND 9α -
BROM-11-KETO-PROGESTERON.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

D i e t e r F r i e d b u r g
aus Hamburg

1961



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München.

Referent: Privatdozent Dr. R. Kaiser

Coreferent: Professor Dr. W. Bickenbach

Dekan: Professor Dr. Dr. H. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 1. 1961

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsübersicht.

- A. Einleitung.
- B. Allgemeiner Teil.
 - 1. Chemie, Synthese, Stoffwechsel und zentrale Wirkung der Corticosteroide.
 - 2. Der Stoffwechsel des Progesterons.
 - 3. Stoffwechsel und Wirkung des Bromketo-progesterons.
- C. Methodischer Teil.
 - 1. Bestimmungsmethoden für Corticosteroide.
 - 2. Angewandte Methode.
- D. Spezieller Teil.
 - 1. Die Wirkung von Progesteron und Bromketo-progesteron auf die Ausscheidung der Corticosteroide.
 - 2. Eigene Ergebnisse.
 - 3. Diskussion.
 - 4. Zusammenfassung.
 - 5. Literaturverzeichnis.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsübersicht.

- A. Einleitung.
- B. Allgemeiner Teil.
 - 1. Chemie, Synthese, Stoffwechsel und zentrale Wirkung der Corticosteroide.
 - 2. Der Stoffwechsel des Progesterons.
 - 3. Stoffwechsel und Wirkung des Bromketo-progesterons.
- C. Methodischer Teil.
 - 1. Bestimmungsmethoden für Corticosteroide.
 - 2. Angewandte Methode.
- D. Spezieller Teil.
 - 1. Die Wirkung von Progesteron und Bromketo-progesteron auf die Ausscheidung der Corticosteroide.
 - 2. Eigene Ergebnisse.
 - 3. Diskussion.
 - 4. Zusammenfassung.
 - 5. Literaturverzeichnis.

Einleitung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausscheidung von freien cortisonartigen Porter-Silber-Chromogenen im Urin nach Verabreichung von Progesteron und 9 α -Brom-11-keto-progesteron ("Broxoron") untersucht. Veranlassung für diese Arbeit waren neuere Versuchsergebnisse mit radioaktiv markiertem Progesteron, wonach dieses durch die Nebenniere (NN) in Corticosteroide umgewandelt wird. Bisher liegen aber keine Beweise dafür vor, daß diese Umwandlung auch eine Veränderung der Ausscheidung der Nebennierenrinden-Hormone (NNR-Hormone) zur Folge hat. Infolgedessen schien es von Interesse, dieser Frage nachzugehen.

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde außer Progesteron auch die Wirkung eines synthetischen halogenierten Progesteronderivates auf die Ausscheidung der NNR-Hormone im Urin geprüft. Diese Substanz hat eine gestagene Wirkung, vor allem wird ihr jedoch ein starker Hemmeffekt auf die Gonadotropin-Fraktion des Hypophysenvorderlappens (HVL) zugeschrieben. Da Gestagene heute immer größere therapeutische Bedeutung gewinnen, ist es notwendig, daß ihre Rückwirkungen auf das hormonale Regulationssystem des Organismus und die Möglichkeiten der Beeinflussung verschiedener Inkretdrüsen bekannt sind. Durch die vergleichende Untersuchung der Ausscheidung der NNR-Hormone im Urin nach Gabe von Progesteron und 9 α -Brom-11-keto-progesteron sollte außerdem festgestellt werden, ob durch die Halogenierung und die Anlagerung einer Ketogruppe an das Progesteronmolekül eine Änderung in der Beeinflussung der NNR-Hormonausscheidung auftritt.

Die Interpretation der Ergebnisse und eine kritische Stellungnahme erfordern die Kenntnis der mit diesen Fragen zusammenhängenden endokrinologischen Grundlagen, die deshalb am Anfang dieser Arbeit zusammengestellt wurden.

Allgemeiner Teil.

1. Nebennierenrinden-Hormone.

Die Nebennierenrinde (NNR), deren lebenswichtige Bedeutung Addison und Brownesequart 1855/56 erkannten, produziert über 40 Steroide. 7 dieser Verbindungen zeigen im Tierversuch die für die NNR-Extrakte kennzeichnenden Wirkungen.

Da die eine Gruppe dieser Hormone mehr auf den Kohlenhydrat-Eiweiß-Stoffwechsel, die andere mehr auf den Mineralstoffwechsel wirkt, ist eine Einteilung in Gluko- und Mineralo-Corticoide (Corticoide sind NNR-Hormone und ihre Metaboliten) möglich geworden.

Beide Hormongruppen unterscheiden sich auch in ihrer chemischen Struktur: Die Gluko-Corticoide tragen an C_{11} eine freie Alkohol- oder Ketogruppe, die Mineralo-Corticoide nicht.

Dieser dualistischen Auffassung steht die unitaristische Auffassung Verzárs (35) gegenüber. Verzárs vermutet, daß alle Hormone primär auf den Kohlenhydrat-Energie-Haushalt wirken und die Mineralstoffwechselwirkung sekundär als Folge energetischer Veränderungen entsteht.

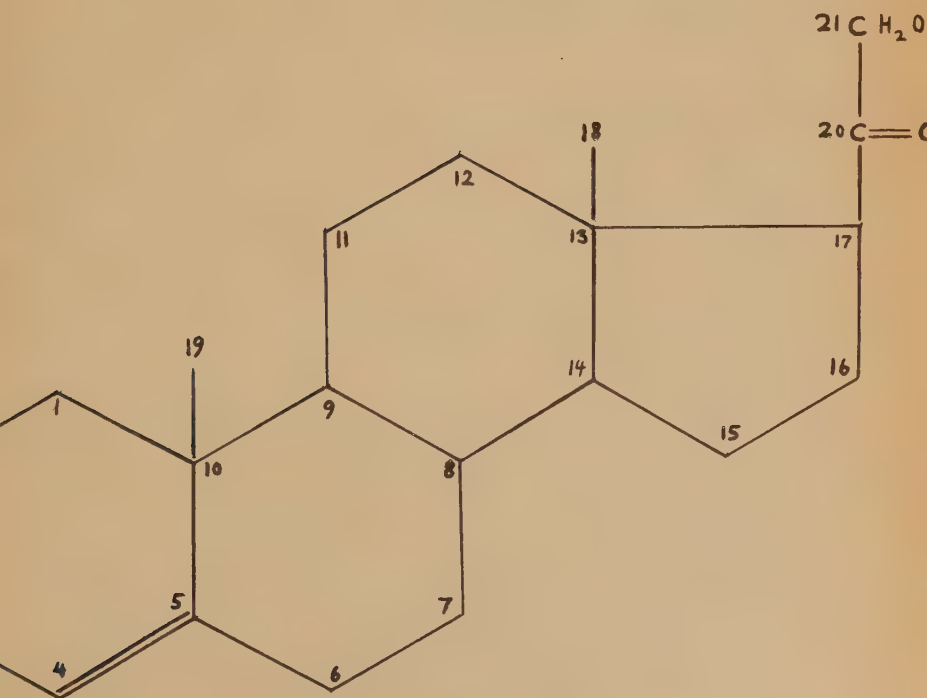
In der Tat überschneiden sich die physiologischen Wirkungen der einzelnen Hormone (42;21), und bis zur Entdeckung des Aldosterons war kein Hormon bekannt, das eine hohe spezifische Wirkung auf den Mineralstoffwechsel hatte. Die Entdeckung des Aldosterons und seiner äußerst aktiven Wirkung auf den Mineralstoffwechsel scheint aber die Einteilung in Gluko- und Mineralo-Corticoide zu rechtfertigen (38).

Die sieben eigentlichen NNR-Hormone sind Derivate des Δ^4 -Pregnens. Diese Verbindung besitzt 21 Kohlenstoffatome, die einen Steranring

mit einer zweiatomigen Seitenkette an C_{17} bilden. Zwischen den Kohlenstoffatomen in Stellung 4 und 5 liegt eine Doppelbindung.

Die einzelnen aktiven Hormone unterscheiden sich in der Substitution des Δ 4-Pregnens. Allen gemeinsam ist eine Ketogruppe an C_3 und C_{20} sowie eine Alkoholgruppe an C_{21} . Die Substitution der übrigen Wasserstoffatome wechselt.

Die Anordnung der Substituenten und die Namen der einzelnen Hormone sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:



Mineralo-Corticoide.

Bezeichnung des Hormons	Substituent in Stellung		
	11	17	18
11-Desoxy-corticosteron / 4-Pregnen-3,20-dion-21-ol Reichenstein Q Cortexon	-	-	-
11-Desoxy-17-hydroxy-corticosteron / 4-Pregnen-3,20-dion-17,21-diol Reichenstein S	-	OH	-
Aldosteron Elektrocortin (Die Aldehydgruppe an C ₁₈ bildet mit der Alkoholgruppe in Stellung 11 ein cyclisches Halbacetal)	(OH	-	OH)

Gluko-Corticoide.

Bezeichnung des Hormons	Substituent in Stellung	
	11	17
Corticosteron / 4-Pregnen-3,20-dion-11,21-diol Kendall B Reichenstein H	OH	-
11-Dehydro-corticosteron / 4-Pregnen-3,11,20-trion-21-ol Kendall A	O	-
17-Hydroxy-corticosteron / 4-Pregnen-3,20-dion-11,17,21-triol Kendall F Reichenstein M Cortisol	OH	OH
17-Hydroxy-11-dehydro-corticosteron / 4-Pregnen-3,11,20-trion-17,21-diol Kendall E Reichenstein Fa Wintersteiner F Cortison	O	OH

Wie P i n c u s und Mitarb. (10) im Durchströmungsversuch an isolierten NN zeigen konnten, werden Cholesterin und Δ^5 -Pregnenolen in Steroidhormone umgewandelt. Diese Substanzen können daher als Ausgangsprodukte für die Biosynthese der Steroidhormone angesehen werden.

B l o c h (2) wies schon 1945 nach, daß Cholesterin in Pregnandiol, ein Reduktionsprodukt des Progesterons, umgewandelt wird. Nach oraler Gabe von markiertem Cholesterin konnte er aus dem Urin einer Schwangeren markiertes Pregnandiol isolieren. Dieser Befund wurde von P l o t z (25) bestätigt.

Progesteron kann aufgrund der Durchströmungsversuche von P i n c u s (17) direkt aus Δ^5 -Pregnenolon entstehen. Es entspricht in seiner chemischen Struktur einem 11-Desoxy-corticosteron ohne Alkoholgruppe an C₂₁.

Nach Z a n d e r (41) ist die Annahme begründet, daß Progesteron in den steroidbildenden Drüsen aus Acetat und Cholesterin entsteht.

Daher kann folgender Weg für die Synthese angenommen werden (34):

Acetat-Cholesterin- Δ^5 -Pregnenolon-Progesteron

Allerdings ist noch nicht ganz klar, ob die Biosynthese grundsätzlich über Cholesterin als Zwischenprodukt verläuft. (41).

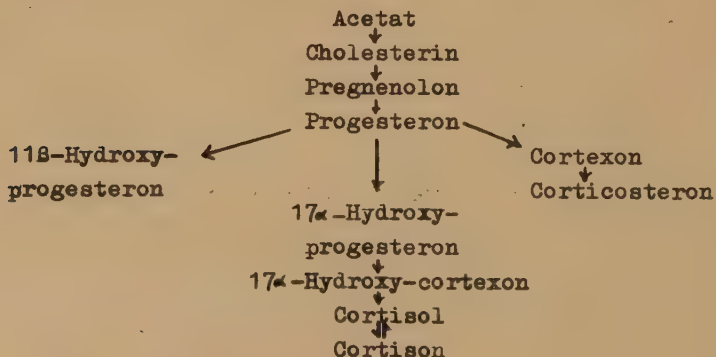
P i n c u s und Mitarb. (10; 17) gelang im Durchströmungsversuch an isolierten NN der Nachweis, daß Progesteron und Δ^5 -Pregnenolon in höher hydroxylierte Steroide umgewandelt werden. Sie erhielten 11-Hydroxy-progesteron, Corticosteron und 17-Hydroxy-corticosteron. Es erfolgte also eine Hydroxylierung an den Kohlenstoffatomen 11, 17 und 21.

Diese Hydroxylierung konnte auch in vivo am

Menschen bewiesen werden. Nach Injektion von C^{14} -4-
Progesteron (Progesteron mit radioaktivem Kohlen-
stoff in Stellung 4 des Ringgerüsts) fand
P l o t z (25) bei einer Frau in der Schwanger-
schaft und bei einer Frau mit M. Cushing radio-
aktives Cortisol und Cortison im Urin. Allerdings
handelt es sich in diesem Fall nur um einen
qualitativen Nachweis dieses Umbaues, sodaß über
das Ausmaß der Reaktion keine Angaben gemacht wer-
den können.

Versuche von P i n c u s (17) sowie von
S a m u e l s (23) führten zu dem Ergebnis,
daß die Hydroxylierung nur in der Reihenfolge 17,
21, 11 möglich ist. W e t t s t e i n (37)
teilte allerdings mit, daß diese strenge Auffassung
heute nicht mehr haltbar sei, doch verlaufen die
hauptsächlichen normalen Reaktionen in dieser
Reihenfolge.

Cortisol kann, wie C o p e und Mitarb.
(7) mitteilen, in Cortison umgebaut werden; zwischen
beiden Verbindungen entsteht ein dynamisches Gleich-
gewicht. Daher wird angenommen, daß die Synthese
nach folgendem Schema abläuft (modifiziert nach
S a m u e l s):



Progesteron nimmt demnach eine zentrale Stel-
lung in der Synthese der NNR-Hormone ein, es wurde
deshalb von D o r f m a n (8) als "basic compound"
bezeichnet.

Die Produktion der NNR-Hormone unterliegt der Regulation durch den Hypophysenvorderlappen (HVL). Dieser scheidet ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus, das die Voraussetzung für eine permanente Hormonproduktion und Erhaltung der Struktur der NNR ist (22). ACTH stimuliert besonders die Produktion von Gluko-Corticoiden (29).

Die NNR-Hormone bewirken rückläufig eine Hemmung der ACTH-Produktion. Der Grad der Hemmung ist, wie S a y e r s und Mitarb. (28) durch Injektionsversuche zeigen konnten, der injizierten Menge von NNR-Hormonen proportional. Diese humorale Selbstregulation verläuft langsam (19).

Der humoralen Selbstregulation ist die schnell verlaufende neuro-humorale Regulation übergeordnet. L o n g (19) nimmt folgenden Weg an:

Sympathicusreizung
↓
Adrenalinausschüttung
↓
Stimulierung der Hypophyse
↓
Ausschüttung von ACTH

Diese Regulation scheint im Stress wirksam zu sein. Stress ist nach S e l y e (29) eine Alarmreaktion des Organismus auf die verschiedensten Belastungen.

P i n c u s (10) konnte nachweisen, daß ACTH im Durchströmungsversuch die Hydroxylierung der Steroid-Vorstufen nicht verstärkt, man muß daher annehmen, daß sein Einfluß auf die Synthese vor der Bildung von Progesteron liegt. P i n c u s (10) vermutet, daß ACTH den Abbruch der Seitenkette des Cholesterins und damit dessen Umwandlung in C_{21} -Steroide katalysiert.

Der überwiegende Teil der Gluko-Corticoide wird vor der Ausscheidung inaktiviert. Die wichtigsten hierbei entstehenden Metaboliten sind in

folgender Tabelle zusammengestellt (in Anlehnung an W e t t s t e i n (37)):

1. 5 β -Konfiguration und 3 α -Hydroxyl
(Tetrahydro-Verbindungen)
2. 5 α -Konfiguration und 3 α -Hydroxyl
(Allotetrahydro-Verbindungen)
3. 20-hydroxylierte Verbindungen
(Cortol und Cortolon)
4. Steroide mit 19 Kohlenstoffatomen.

Die Tetrahydro-Verbindungen entstehen durch Reduktion der Doppelbindung zwischen C₄ und C₅ sowie durch Reduktion der Ketogruppe an C₃, ihre Stereoisomere sind die Allotetrahydro-Verbindungen.

Cortol und Cortolon entsprechen Tetrahydro-Verbindungen, deren Ketogruppe an C₂₀ zu einer Alkoholgruppe reduziert ist.

Durch Abbau der Seitenkette an C₁₇ entstehen aus den NNR-Hormonen Verbindungen mit 19 Kohlenstoffatomen. Tragen sie an C₁₇ eine Ketogruppe, so werden sie als 17-Ketosteroide bezeichnet.

Die Ausscheidung der Gluko-Corticoide und ihrer Metaboliten erfolgt zum weitaus größten Teil im Urin. H e l l m a n n und Mitarb. (9) fanden nach Injektion von radioaktiv markiertem Cortisol 70-80% der Radioaktivität im Urin der nächsten 24 Stunden, nur 9% wurden im Stuhl der folgenden 4 Tage ausgeschieden. Die Werte von C o p e und Mitarb. (7) liegen sogar noch höher, 86% der injizierten Cortisol-Radioaktivität und 76% der Radioaktivität des injizierten Cortisons wurden im Urin der folgenden 24 Stunden gefunden.

Z a n d e r (40.) berichtet über eine Ausscheidung der NNR-Hormone durch die Haut bei starker Schweißabsonderung.

Im Urin werden hauptsächlich Metaboliten der Gluko-Corticoide ausgeschieden. Man findet aber

auch die aktiven Hormone selbst, allerdings nur in geringer Menge.

Zum überwiegenden Teil erfolgt die Ausscheidung der Metaboliten in gebundener Form. Tetrahydro-Verbindungen werden fast in ihrer Gesamtheit durch die Leber in 3-Stellung an Glukuronsäure gebunden (37), nur ein sehr geringer Teil scheint frei ausgeschieden zu werden.

Die Bindung der aktiven Hormone an Glukuronsäure kann nur in Stellung 21, 17 oder 11 erfolgen. C_{21} - und C_{17} -Glukuronide sind sehr leicht spaltbar, daher ist höchstens mit einer Ausscheidung von C_{11} -Glukuroniden zu rechnen (32). Cortison trägt aber an C_{11} eine Ketogruppe, eine glykosidische Bindung ist daher an dieser Stelle nicht möglich. Zudem fanden C o p e und Mitarb. (7), daß Cortisol und Cortison die wichtigsten Bestandteile der nach Ansäuerung auf ph 1 chloroformlöslichen Fraktion sind.

Da nach S c h n e i d e r (30) die Ausbeute an Cortisol und Cortison durch Hydrolyse bei ph 1 nur gering ansteigt (Cortison um ca. 16%), ist anzunehmen, daß Cortisol und Cortison zum größten Teil frei ausgeschieden werden.

In der folgenden Tabelle sind die in 24 Stunden ausgeschiedenen Mengen der einzelnen Hormone und ihrer Metaboliten angegeben:

	Burton (5)	Bush (6)	Romanoff (27)	Wettstein (37)
Cortison	15-40%			
Cortisol	15-40%			
Tetrahydrocortison		3,4 mg	3,1 mg	bis 5 mg
Tetrahydrocortisol		2,0 mg	1,3 mg	bis 3 mg

	Burton (5)	Bush (6)	Romanoff (27)	Wettstein (37)
Allo-tetrahydro-cortison		Spuren		
Allo-tetrahydro-cortisol		0,8 mg	1,3 mg	1-2 mg
Cortol und Cortolon				ca. 3 mg

Die 17-Ketosteroide stammen nur zum Teil aus dem Corticoidstoffwechsel. Nach Labhart (16) werden höchstens 10 bzw 15% Cortison und Cortisol in 17-Ketosteroide umgebaut.

Cortison und Cortisol sowie ihre Tetrahydro-Verbindungen erscheinen im Urin zu etwa gleichen Teilen in freier Form (4). Nach Angaben von Cope und Mitarb. (7) machen die Tetrahydro-Verbindungen etwa 30% der bei pH 1 extrahierbaren Corticoide aus.

Nach Injektion von Cortison steigen freie und gebundene Corticoide im Urin an (4), der Anstieg der freien Corticoide ist aber im Verhältnis höher als der der gebundenen (4).

Veränderungen der Konzentration von Cortisol und Cortison im Organismus lassen sich daher durch Untersuchungen der freien 17-Hydroxycorticoide im Urin gut verfolgen.

2. Der Stoffwechsel des Progesterons.

Injiziertes Progesteron ist nur kurze Zeit im Blut nachweisbar; sehr bald wird es im Fettgewebe abgelagert (15). Einige Stunden nach intramuskulärer Injektion beträgt diese Deponierung bis zu 40% (24).

Im Blut wird Progesteron vermutlich unverändert transportiert, sodaß es in aktiver Form in die

verschiedenen Organe gelangen kann (41).

Progesteron scheint im Wesentlichen zu Pregnandiol abgebaut zu werden. K a i s e r (11;12) fand nach Progesteroninjektion innerhalb von fünf Tagen 10-20% der injizierten Progesteronmenge als Pregnandiol im Urin. W i e s t (39) konnte nach Injektion von C^{14} -4-Progesteron bei einer Frau mit Gallenfistel innerhalb 12 Stunden 40% der injizierten Gesamtradioaktivität in der Galle nachweisen. Das Ausscheidungsprodukt war zum größten Teil Pregnandiol-Glukuronid. Pregnandiol ist ein Reduktionsprodukt des Progesterons. Es entsteht aus dem Progesteron durch Umwandlung der Ketogruppen an C_3 und C_{20} in Alkoholgruppen und reduktive Auflösung der Doppelbindung zwischen C_4 und C_5 .

Allerdings machen es Untersuchungen von B a r r y und Mitarb. (1) wahrscheinlich, daß auch ein Teil des Progesterons durch Seitenkettenabbau inaktiviert wird.

Es ist also anzunehmen, daß der NNR nur ein Teil des injizierten Progesterons angeboten wird.

Wie schon erwähnt, entstehen durch Umbau des Progesterons in der NN cortisonartige Substanzen (10; 17; 23; 25); quantitative Blut- oder Harnuntersuchungen liegen bisher nicht vor, sodaß keine Angaben über das Ausmaß dieses Umbaues gemacht werden können.

3. Stoffwechsel und Wirkung des Bromketoprogesterons.

Über den Stoffwechsel des 9 α -Brom-11-ketoprogesterons (Progesteron, das an C_{11} eine Keto-Gruppe trägt und dessen Wasserstoff an C_9 in α -Stellung durch Brom ersetzt ist) liegen bisher keine Untersuchungen vor.

9 α -Brom-11-keto-progesteron scheint eine starke Hemmwirkung auf die Gonadotropin-Fraktion des HVL auszuüben. L i p s c h u t z und Mitarb. (18) untersuchten die antiluteinisierende Wirkung dieses Steroids am Milz-Ovar (nach Kastration in die Milz autotransplantiertes Ovar) des Meerschweinchens. Bei Tieren, die mit 47-73 μ Oestradiol täglich vorbehandelt wurden, bewirkte eine mittlere Tagesmenge von 38 mg 9 α -Brom-11-keto-progesteron eine vollständige Hemmung der Luteinisierung.

Methodischer Teil.

1. Bestimmungsmethoden für NNR-Hormone.

Zur quantitativen Bestimmung von Corticoiden stehen biologische und chemische Methoden zur Verfügung.

Die meisten biologischen Methoden weisen die spezifischen Hormonwirkungen im Tierversuch nach und haben den Vorteil, daß sie für die Identität der untersuchten Substanzen mit den aktiven Hormonen garantieren. Ihr Nachteil liegt in der relativ großen Fehlerbreite.

Die chemischen Methoden beruhen auf Extraktion der Hormone aus dem Urin, Reinigung des Extraktes und Nachweis einer die einzelnen Hormone kennzeichnenden chemischen Gruppe. Da solche Gruppen meistens mehreren Hormonen gemeinsam sind, kann keine absolute Spezifität erwartet werden.

Für die Corticoide ist die Ketol-Seitenkette charakteristisch, sie wird mit folgenden Reaktionen erfaßt (43):

1. Formaldehyd-Abspaltung.
2. Reduktionsverfahren.

3. 17-Ketosteroid-Bildung bei milder Oxydation.
4. Phenylhydrazon-Bildung.

Der Nachweis durch Formaldehyd-Abspaltung und Reduktionsverfahren ist wenig spezifisch; außer Corticoiden können auch andere Substanzen erfaßt werden. Zudem reagieren außer den 17-Hydroxycorticoiden auch Corticoide ohne Hydroxylgruppe an C₁₇. Weitgehend spezifisch für die 17-Hydroxycorticoide sind die Phenylhydrazon-Bildung und die 17-Ketosteroid-Bildung bei milder Oxydation. Das letztgenannte Verfahren erfaßt aber außer den freien auch die gebundenen Corticoide.

Die Extraktion erfolgt mit organischen Lösungsmitteln. Sie kann mit oder ohne vorherige Hydrolyse des Urins vorgenommen werden. Bei der hohen Empfindlichkeit der Corticoide verbietet sich aber eine zu starke Hydrolyse (43).

Wichtig ist die vollständige Erfassung einer Hormongruppe bei der Extraktion, sie ist vom Lösungsmittel abhängig. Corticoide werden mit Chloroform bei dreimaliger Extraktion zu 100% erfaßt, soweit sie in freier Form vorliegen (43). Um eine Erfassung der an Glukuronsäure gebundenen Corticoide zu erreichen, ist die Extraktion mit Butanol nötig.

Bei der Extraktion besteht die Möglichkeit, Mineralo- und Gluko-Corticoide zu trennen. Dies wird durch die Verteilung zwischen einer angesäuerten wässrigen Phase und Petroläther erreicht (20). Der Nachteil dieser Methode liegt in ihrer großen Anfälligkeit gegenüber den verschiedensten Störungen, zur Erzielung zuverlässiger Ergebnisse ist daher eine lange Einarbeitungszeit nötig.

Mit Hilfe chromatographischer Verfahren ist es möglich, die Steroidhormone einzeln nachzuweisen. Diese Methoden sind aber zeitraubend und verhältnismäßig kompliziert, sodaß sich für die Belange der Klinik die einfacheren Gruppenreaktionen durchgesetzt haben.

2. Angewandte Methode.

Für die Bearbeitung der Fragestellung wurde eine Kombination zweier Verfahren gewählt. Die Extraktion der Corticoide aus dem Urin erfolgte mit dem von S t a u d i n g e r und S c h m e i s s e r (32;33) angegebenen Verfahren. Zur Färbung der extrahierten Corticoide wurde die Methode von P o r t e r und S i l b e r (26) verwendet.

Das Verfahren nach S t a u d i n g e r und S c h m e i s s e r (32;33) erfaßt bei Extraktion mit Chloroform nur die freien Corticoide. Erhöhungen des Corticoid-Spiegels im Blut, wie sie beispielsweise nach Cortison-Injektion entstehen, zeigen sich rasch und deutlich auch in einer erhöhten Ausscheidung dieser Corticoidfraktion (4). Das verwendete Verfahren hat den Vorteil, die genannte Hormongruppe spezifisch nachzuweisen; es ist also zum Nachweis von Veränderungen des Corticoid-Spiegels im Blut gut geeignet.

Die Extraktion verläuft im Prinzip folgendermaßen:

Nach Ansäuerung des Urins auf pH 4 wird mit Chloroform extrahiert und anschließend das Chloroform abdestilliert. Man verteilt den Rückstand zwischen Petroläther und Salzsäure-Alkohol und extrahiert aus der wässrigen Phase (Salzsäure-Alkohol) die Corticoide mit Chloroform. Dieser Extrakt wird mit Natronlauge und Schwefelsäure gewaschen und zur Trocknung durch Kieselgel filtriert.

Dieses Verfahren vermeidet durch die Extraktion bei pH 4 eine Zerstörung der säureempfindlichen Corticoide (30;43) und ermöglicht eine weitgehende Auswaschung störender Harnpigmente durch einen langen Reinigungsgang. Die Verteilung zwischen wässriger Phase und Petroläther eliminiert einen

Teil der in Petroläther leicht löslichen Mineralo-Corticoide, die in Wasser leicht löslichen Glukocorticoide werden hiervon kaum berührt (20).

Zum quantitativen Nachweis der Hormone wurde die von Porter und Silber (26) angegebene Methode verwendet. Sie beruht auf einer Farbentwicklung nach Zusatz von Phenylhydrazin-Schwefelsäure mit Messung der Farbdichte im Photometer. Bei Anwesenheit von 17,21-Dihydroxy-20-ketosteroiden entwickelt sich nach Zusatz von Phenylhydrazin-Schwefelsäure eine gelbe Farbe (26). Die für diese Reaktion wichtige Dihydroxyaceton-Gruppierung besitzt außer Cortison und Cortisol sowie ihren Tetrahydro- und Allotetrahydro-Verbindungen nur noch ein Corticoid, das 17-Hydroxy-11-desoxy-corticosteron. Diese Substanz, ein Mineralo-Corticoid, ergibt also ebenfalls eine Farbentwicklung mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure (26).

Burton und Mitarb. (4) konnten in der Fraktion der $C_{21}O_4$ -Corticoide nach Extraktion bei pH 1 drei α -Ketole im Urin nachweisen. Es ist denkbar, daß eine dieser Substanzen das 17-Hydroxy-11-desoxy-corticosteron ist. Seine Exkretionsrate beträgt höchstens 40% in 24 Stunden.

Dieses Mineralo-Corticoid wird zwar möglicherweise bei der Farbreaktion nach Porter und Silber miterfaßt (34), bei der hier gewählten Extraktionsmethode wird es aber zum Teil durch die Verteilung zwischen Petroläther und wässriger Phase eliminiert.

Im Wesentlichen werden mit dem beschriebenen Verfahren Cortison, Cortisol und ihre Tetrahydro- und Allotetrahydro-Verbindungen, soweit sie in freier Form vorliegen, erfaßt. Die Methode ist also weitgehend spezifisch für "freie cortisonartige Steroide". Die Normalwerte der Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin liegen bei 100% in 24 Stunden (31;34).

Die Bestimmung der Porter-Silber-Chromogene im Urin wird durch sehr viele Chemotherapeutica gestört. Daher müssen vor Beginn der Versuche alle Medikamente abgesetzt werden.

Da für die Versuche nur Frauen mit weitgehend erloschener Ovarialfunktion und voll funktions-tüchtiger NNR in Frage kamen, wurden Patientinnen in der Menopause und nach Ovariektomie bzw. Röntgenkastration ausgewählt. Sie befanden sich zur Zeit der Versuche in gutem Allgemeinzustand und erhielten weder Medikamente noch Bestrahlungen. Stress-Situationen wurden also weitgehend ausgeschaltet. Die Verarbeitung des 24-Stunden-Urins erfolgte jeweils sofort; vor der Verabreichung der zu prüfenden Substanz wurden zwei Ausgangswerte bestimmt.

Arbeitsvorschrift:

200 ml des frischen 24-Stunden-Urins werden mit 2 ml Eisessig angesäuert und anschließend 5 mal mit je 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Emulsionen läßt man mindestens 10 min bei 3000 Umdr./min zentrifugieren. Nach Absaugen der Urinschicht wird durch ein Faltenfilter filtriert und bei mäßiger Temperatur unter schwachem Vakuum abdestilliert.

Den Rückstand löst man in 10 ml Petroläther und 5 ml HCl-Alkohol (1%) und führt ihn in den Scheidetrichter B über.

Der Scheidetrichter A wird mit 10 ml Petroläther und 10 ml 1n HCl gefüllt.

Nun schüttelt man B und läßt die untere Schicht (HCl-Alkohol) in A ab. Den Kolben, in dem destilliert wurde, spült man 3 mal mit je 5 ml HCl-Alkohol in B aus, schüttelt B jedesmal und läßt dann die untere Schicht in A ab. Zuletzt wird die obere Schicht von B verworfen.

Nach Schütteln von A wird die untere Schicht (HCl-Alkohol) in B übergeführt und die obere verworfen.

Darauf schüttelt man B 4 mal mit je 5 ml Chloroform und läßt die untere Schicht (Chloroform) jeweils in A ab. Zuletzt wird die obere Schicht verworfen.

Nun wird A mit 5 ml $n/2$ NaOH geschüttelt, die untere Schicht (Chloroform) in B übergeführt und die obere verworfen.

B schüttelt man mit 5 ml $n/10$ NaOH und läßt die untere Schicht (Chloroform) in A ab.

Jetzt schüttelt man A mit 5 ml $n/10$ H_2SO_4 und filtriert die untere Schicht (Chloroform) durch Blaugel, das vorher mit 10 ml Chloroform gewaschen wurde. Das Blaugel wird mit Chloroform nachgewaschen. Nach Vereinigung beider Chloroformlösungen und genauer Teilung wird in zwei Rundkolben unter leichtem Vakuum bei mäßiger Temperatur abdestilliert.

Zur Färbung pipettiert man in jeden Kolben 1 ml Methanol. In Kolben A (Blindwert) kommen 8 ml verdünnte H_2SO_4 , in Kolben B (Vollwert) 8 ml Phenylhydrazin-Schwefelsäure.

Die Bereitung der Schwefelsäure und der Phenylhydrazin-Schwefelsäure geschieht wie folgt:

Man mischt 190 ml aqua dest. mit 310 ml H_2SO_4 (1,84) und gibt auf 100 ml verdünnte H_2SO_4 65 mg Phenylhydrazin.

Nach Lösung des Rückstandes wird dieser in Reagenzgläser übergefüllt und 20 min im Wasserbad bei $60^\circ C$ erwärmt. Nach Abkühlung unter fließendem Wasser erfolgt die Messung des Vollwertes gegen den Blindwert mit dem Photometer "Beckman" bei 405 m μ .

Von der abgelesenen Extinktion muß der Reagenzienleerwert abgezogen werden. Er wird durch Messung von 8 ml Phenylhydrazin-Schwefelsäure + 1 ml Methanol gegen 8 ml verdünnte Schwefelsäure + 1 ml Methanol ermittelt.

Aus der reduzierten Extinktion werden mit Hilfe einer Eichkurve, die mit aufsteigenden Cortisonmengen aufgestellt wurde, die Corticoidwerte in $\frac{8}{100}$ ml Urin ermittelt und auf die 24-Stunden-Urinmenge umgerechnet. Die Eichkurve verläuft linear.

Der lange Reinigungsgang und die geringen Mengen an extrahierbarer Substanz bedingen einen verhältnismäßig hohen Arbeitsverlust. Nach Einarbeitung in die Methode ist dieser aber weitgehend konstant.

Die Ermittlung des Arbeitsverlustes erfolgte durch Wiedergewinnungsversuche. Reines Cortison wurde dem Urin in bekannter Menge zugesetzt und anschließend eine Corticoidbestimmung durchgeführt. Nach Abzug der in einer Leerprobe des Urins enthaltenen Corticoidmenge resultiert die wiedergefundene Menge an Cortison.

Nach Abzug der Reagenzienleerwerte ergaben sich bei fünf Versuchen folgende mittleren Extinktionen:

1 ml Cortisonlösung	0,772
Corticoide in 100 ml Urin (Leerprobe)	0,045
Extrakt aus 100 ml des gleichen Urins nach Zugabe von 1 ml Cortisonlösung	0,610

Nach Abzug der Extinktion der Leerprobe beträgt die Extinktion der wiedergefundenen Cortisonmenge 0,565, also 73% der Extinktion der zugesetzten Cortisonmenge. Demnach macht der Arbeitsverlust 27% aus, er wurde bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Die Berechnung des Arbeitsverlustes aus dem Verhältnis der Extinktionen ist nur, wie in diesem Fall, bei linearem Verlauf der Eichkurve möglich.

Spezieller Teil.

1. Die Wirkung von Progesteron und Bromketoprogesteron auf die Ausscheidung der Corticosteroide.

Aus Versuchen von P i n c u s (10;17), S a m u e l s (23) und P l o t z (25) geht hervor, daß Progesteron im Organismus und auch durch überlebendes NNR-Gewebe in Steroide vom Typ des Cortisons umgebaut wird. Z a n d e r (40) konnte diesen Umbau allerdings nicht nachweisen; er verwendete die quantitative Methode von S t a u d i n g e r und S c h m e i s s e r (32).

Über den Einfluß von 9 α -Brom-11-keto-progesteron auf die Ausscheidung der NNR-Hormone im Urin sind bisher keine Veröffentlichungen erschienen. K a i s e r (13) untersuchte die Wirkung verschiedener anderer synthetischer Gestagene (17 α -Äthyl-19-nor-testosteron, 17 α -Methyl-19-nor-testosteron, 17 α -Äthinyl-19-nor-testosteron) auf die Ausscheidung der Corticosteroide. Bei Verabreichung von 30-100 mg täglich beobachtete er nach Äthyl- und Methylnor-testosteron kein einheitliches Verhalten der freien Corticoide im Urin, lediglich Äthinylnor-testosteronacetat erzeugte eine signifikante Senkung der Corticoidausscheidung (13). Ähnliche Ergebnisse erhielten B r i c h a n t und Mitarb. (3). 17-Äthyl-19-nor-testosteron senkte in einer Dosierung von 30 mg täglich bei einer Frau und 100 mg täglich bei Männern die Urin- und Plasma-Werte der 17-Hydroxycorticoide. Die Ergebnisse werden mit einer Hemmung der adrenocorticotropen Funktion des HVL erklärt.

2. Eigene Ergebnisse.

Untersucht wurde die Ausscheidung der freien cortisonartigen Porter-Silber-Chromogene im Urin

- a) nach intramuskulärer Injektion von Progesteron in Öl gelöst oder als Kristallsuspension (Proluton und Lutocyclin bzw. Lutren)

und b) nach oraler Gabe von 9 α -Brom-11-keto-progesteron (Broxoron).

Die Ergebnisse sind in Tabellen (Fall I bis XIV) und Diagrammen (Fall I bis XIV) zusammengestellt.

Beschreibung der Ergebnisse.

a) Progesteron.

Nach einmaliger Injektion von 100 mg Progesteron-Kristallsuspension i.m. mit ca. einwöchiger Wirkung steigen die Ausscheidungswerte der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin sofort um etwa 100 μ an (Fall I bis IV). In Fall I verstärkt sich dieser Anstieg am zweiten Tage nach der Injektion. Ein Rückgang der Werte ist auch am Ende des Versuches fünf Tage nach der Injektion nicht festzustellen. In Fall II sind von fünf Werten drei ebenso um ca. 50-100 μ erhöht, u.a. auch am letzten Tage. Dazwischen liegen allerdings niedrigere Werte. Fall III zeigt ein ähnliches Verhalten, von drei Werten sind zwei erhöht, der mittlere Wert liegt niedriger.

Eine einmalige Injektion von 100 mg Progesteron in ölicher Lösung i.m. (Fall V) bewirkt einen über die ganze Versuchsdauer anhaltenden Anstieg der Harn-corticoide um etwa 100 μ . Nach Injektion von je 50 mg des gleichen Präparates an zwei aufeinander folgenden Tagen (Fall VI) verläuft der Anstieg treppenförmig mit einem Rückgang am dritten Tage. Am fünften Tage steigt die Corticoidausscheidung wieder um ca. 100 μ gegenüber den Ausgangswerten.

In Fall VII wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen je 30 mg Progesteron in ölicher Lösung i.m. injiziert. Wieder zeigt sich am ersten Tage nach der Injektion ein Anstieg der Corticoidausscheidung, in diesem Falle um etwa 70 μ . An den

folgenden Tagen sinkt die Ausscheidung aber wieder auf die Ausgangswerte zurück, erst am fünften Tage erfolgt ein Anstieg um etwa 90% gegenüber dem Vortage.

Die Ausscheidungswerte der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin vor und nach Injektion von Progesteron sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Fall	Mittelwert in $\frac{1}{24}$ Stunden vor Injektion	nach Injektion	Anstieg in Prozent der Ausgangswerte
I	33 (2 Tg.)	173 (5 Tg.)	423
II	85 (2 Tg.)	123 (5 Tg.)	45
III	84 (2 Tg.)	124 (3 Tg.)	48
IV	144 (2 Tg.)	182 (3 Tg.)	27
V	58 (2 Tg.)	145 (4 Tg.)	150
VI	73 (2 Tg.)	153 (4 Tg.)	110
VII	55 (2 Tg.)	82 (5 Tg.)	49

Fall	Mittelwert vor Injektion in $\frac{1}{24}$ Stunden	Wert am Tage nach Injektion in $\frac{1}{24}$ Stunden	Anstieg in Prozent der Ausgangswerte
I	33 (2 Tg.)	146	342
II	85 (2 Tg.)	176	108
III	84 (2 Tg.)	176	109
IV	144 (2 Tg.)	317	121
V	58 (2 Tg.)	152	162
VI	73 (2 Tg.)	106	45
VII	55 (2 Tg.)	131	139

Der in allen sieben Versuchen nach Injektion von Progesteron auftretende Anstieg der Corticoidausscheidung im Urin unterliegt nach dem Zeichentest nach van der Waerden (36) nur einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,5%. Trotz

der relativ großen Schwankungsbreite der Werte ist der Anstieg der Corticoidausscheidung am ersten Tage nach Progesteroninjektion mit $p=0,004$ signifikant (Zur Berechnung wurden die Tafeln nach P ä t a u herangezogen). Die Ergebnisse können daher als statistisch gesichert gelten.

In einigen Fällen zeigt sich nach Injektion von Progesteron ein Anstieg der Harnmenge. Deutlich ist diese Beeinflussung aber nur in den Fällen, in denen Lutocyclin M verabreicht wurde (Fall I und II).

b) 9 α -Brom-11-keto-progesteron.

In drei Fällen wurden je 100 mg der Substanz an zwei aufeinander folgenden Tagen oral gegeben. In Fall VIII zeigt sich ein geringer Anstieg der Harn-Corticoide über fünf Tage mit Tagesschwankungen, ebenso in Fall X. Dagegen liegen in Fall IX die Tagesausscheidungen an vier Tagen unter den Ausgangswerten.

Drei Frauen erhielten an fünf Tagen je 100 mg des Steroids. In Fall XI ist wieder eine Steigerung, die mit normalen Werten abwechselt, zu erkennen, Fall XII zeigt dagegen bei gleicher Dosierung eine Depression der Corticoidausscheidung, in geringerem Umfang auch Fall XIII.

Die Applikation von 200 mg 9 α -Brom-11-keto-progesteron täglich über vier Tage bewirkt in Fall XIV eine leichte Reduzierung der Corticoidwerte im Urin, lediglich am vierten Tage nach Beginn der Steroidapplikation zeigt sich ein einmaliger Anstieg um fast 100 % gegenüber den Ausgangswerten.

Die nachstehenden Tabellen geben eine Zusammenstellung der Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin vor und nach Verabreichung von 9 α -Brom-11-keto-progesteron.

Fall	Mittelwert in $\delta/24$ Stunden		Änderung in Prozent der Ausgangswerte
	vor Verabreichung	nach Verabreichung	
VIII	38 (2 Tg.)	73 (6 Tg.)	+ 92
IX	177 (2 Tg.)	108 (5 Tg.)	- 39
X	42 (2 Tg.)	67 (5 Tg.)	+ 59
XI	29 (2 Tg.)	55 (5 Tg.)	+ 90
XII	106 (2 Tg.)	85 (5 Tg.)	- 20
XIII	129 (3 Tg.)	97 (5 Tg.)	- 25
XIV	60 (2 Tg.)	59 (4 Tg.)	- 3

Fall	Mittelwert vor Verabreichung in $\delta/24$ Stunden	Wert am Tage nach Verabreichung in $\delta/24$ Stunden	Änderung in Prozent der Ausgangswerte
VIII	38 (2 Tg.)	15	- 61
IX	177 (2 Tg.)	122	- 31
X	42 (2 Tg.)	28	- 33
XI	29 (2 Tg.)	86	+197
XII	106 (2 Tg.)	87	- 18
XIII	129 (3 Tg.)	61	- 53
XIV	60 (2 Tg.)	33	- 45

Am ersten Tage nach Applikation von 9 α -Brom-11-keto-progesteron zeigt sich in sechs von sieben Fällen eine Depression der Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin. Nach dem Zeichentest nach van der Waerden (36) unterliegen diese Ergebnisse einer Irrtumswahrscheinlichkeit von etwas über 2,5%. Eine weitere statistische Sicherung ist bei den ungleichmäßigen Ausgangswerten nicht möglich.

Die Mittelwerte von 4-6 Tagen nach Beginn der Applikation liegen nur in vier von sieben Fällen niedriger als die Ausgangswerte. Daher kann insgesamt nicht von einer eindeutigen Änderung der Corticoidausscheidung nach Applikation des halogenierten Progesteronderivates gesprochen werden.

Ein Einfluß des Steroids auf die Harnmenge ist nicht festzustellen.

Kasuistik.

Fall I: Frau Gr. , 67 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	580	0,032	37	← Lutocyclin M 100 mg
2	720	0,020	29	
3	1250	0,060	146	
4	1020	0,106	209	
5	1190	0,066	152	
6	1060	0,070	143	
7	1180	0,094	214	

Fall II: Frau Sch., 62 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	840	0,057	92	← Lutocyclin M 100 mg
2	770	0,051	77	
3	1520	0,060	176	
4	1140	0,043	97	
5	1160	0,076	171	
6	1240	0,010	25	
7	1100	0,064	138	

Fall III: Frau Bo. , 73 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	2350	0,021	98	← Lutren 100 mg
2	1060	0,034	70	
3	2150	0,041	176	
4	1320	0,031	79	
5	1650	0,036	116	

Fall IV: Frau Pi. , 56 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	850	0,065	106	Lutren 100 mg
2	900	0,110	181	
3	900	0,183	317	
4	780	nicht meßb.	-	
5	920	0,037	67	
6	1100	0,076	162	

Fall V: Frau D. , 48 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	690	0,042	58	Proluton 100 mg
2	605	0,048	57	
3	800	0,098	152	
4	1060	nicht meßb.	-	
5	1220	0,068	162	
6	1280	0,048	120	
7	980	0,077	147	

Fall VI: Frau St. , 40 Jahre, ovariectomiert.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	1400	0,023	63	Proluton 50 mg
2	1380	0,031	83	
3	1850	0,029	106	
4	1400	0,060	163	
5	1040	0,029	60	
6	1050	nicht meßb.	-	
7	1220	0,078	184	

Fall VII: Frau G. , 53 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	960	0,026	48	
2	1380	0,022	61	← Proluton 30 mg
3	1390	0,048	131	← Proluton 30 mg
4	1160	0,025	58	← Proluton 30 mg
5	1570	0,021	62	← Proluton 30 mg
6	1190	0,016	35	← Proluton 30 mg
7	1410	0,045	123	

Fall VIII: Frau Neu. , 78 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	530	0,045	46	
2	650	0,023	29	← Broxoron 100 mg
3	950	0,008	15	← Broxoron 100 mg
4	1060	0,053	109	
5	650	0,036	46	
6	610	0,080	95	
7	910	0,042	75	
8	630	0,079	96	

Fall IX: Frau Mö. , 70 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	1470	0,072	206	
2	1180	0,064	148	← Broxoron 100 mg
3	1250	0,050	122	← Broxoron 100 mg
4	1390	0,021	58	
5	1220	0,002	6	
6	1070	0,043	90	
7	1450	0,100	265	

Fall X: Frau La. , 52 Jahre, ovariektomiert.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	690	0,018	24	
2	910	0,034	60	← Broxoron 100 mg
3	920	0,015	28	← Broxoron 100 mg
4	590	0,076	87	
5	1280	0,017	43	
6	1090	0,029	63	
7	860	0,070	116	

Fall XI: Frau Gö. , 49 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	530	0,029	30	
2	750	0,019	28	← Broxoron 100 mg
3	550	0,080	86	← Broxoron 100 mg
4	600	0,030	35	← Broxoron 100 mg
5	680	0,063	84	← Broxoron 100 mg
6	600	0,052	60	← Broxoron 100 mg
7	720	0,008	12	

Fall XII: Frau Scha. , 46 Jahre, Menopause.

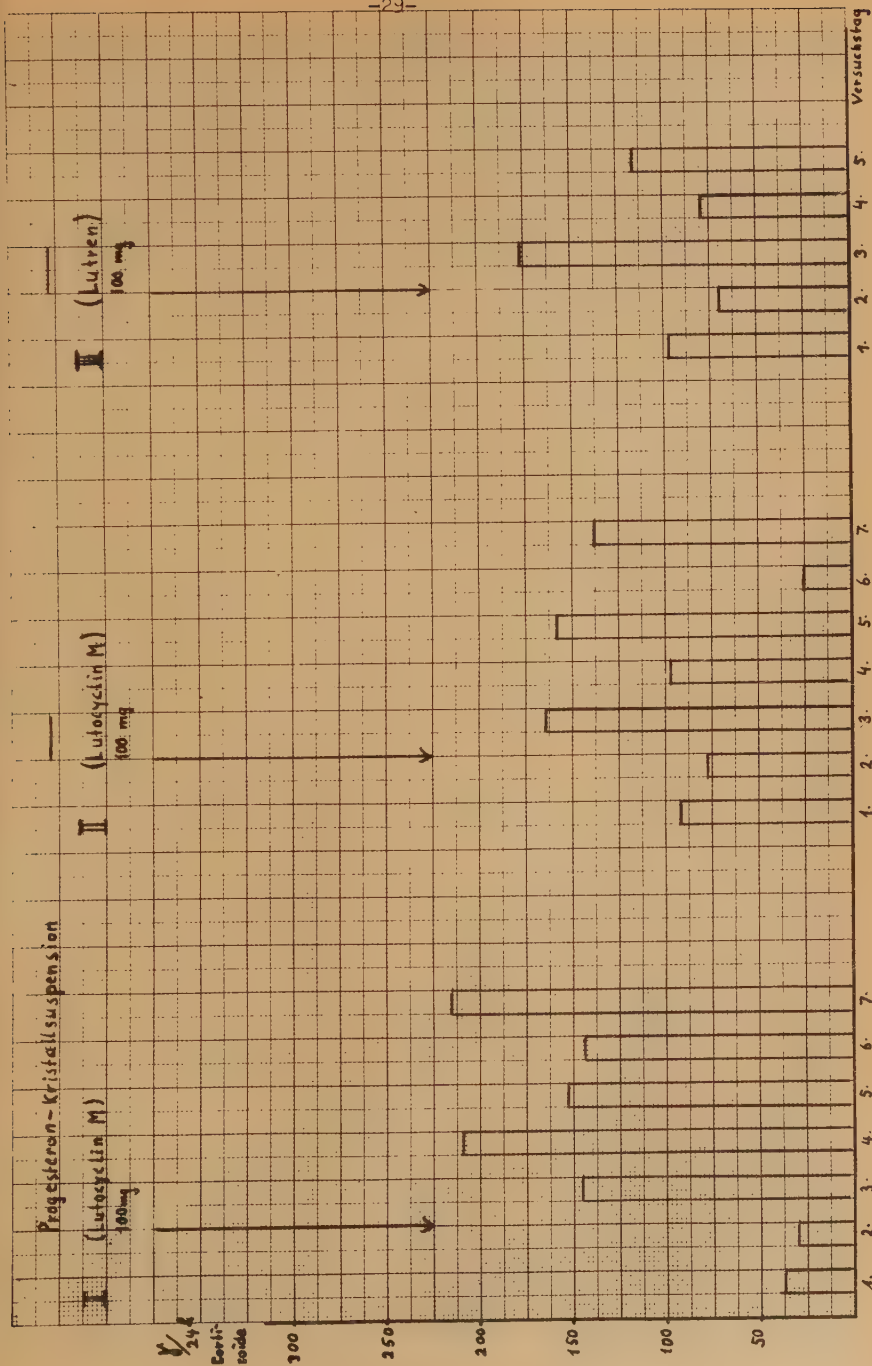
Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	1160	0,046	104	
2	830	0,067	108	← Broxoron 100 mg
3	1070	0,042	87	← Broxoron 100 mg
4	630	0,113	143	← Broxoron 100 mg
5	1080	0,025	54	← Broxoron 100 mg
6	1540	0,026	79	← Broxoron 100 mg
7	1060	0,031	64	

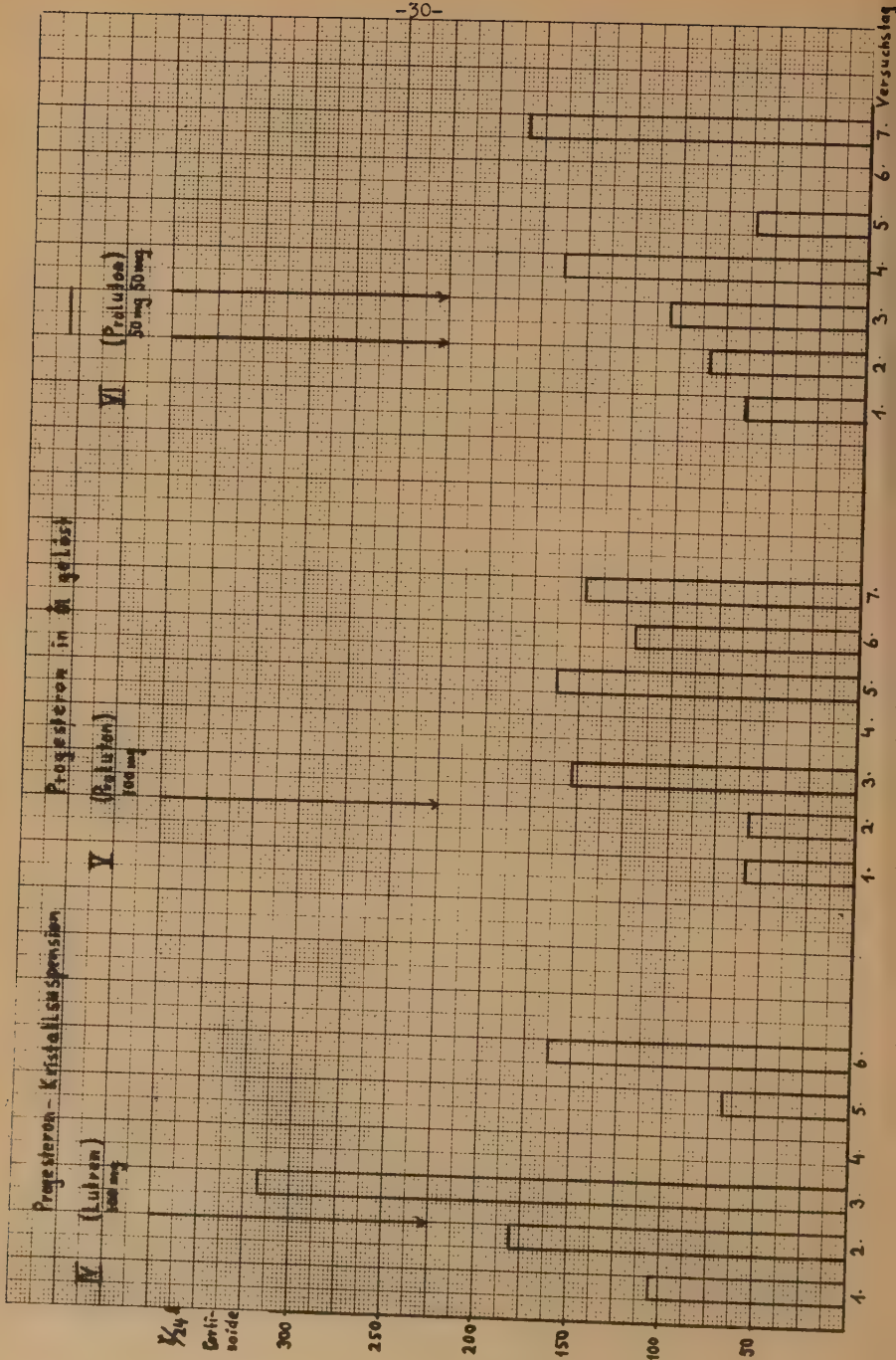
Fall XIII: Frau Ger. , 53 Jahre, radiumkastriert.

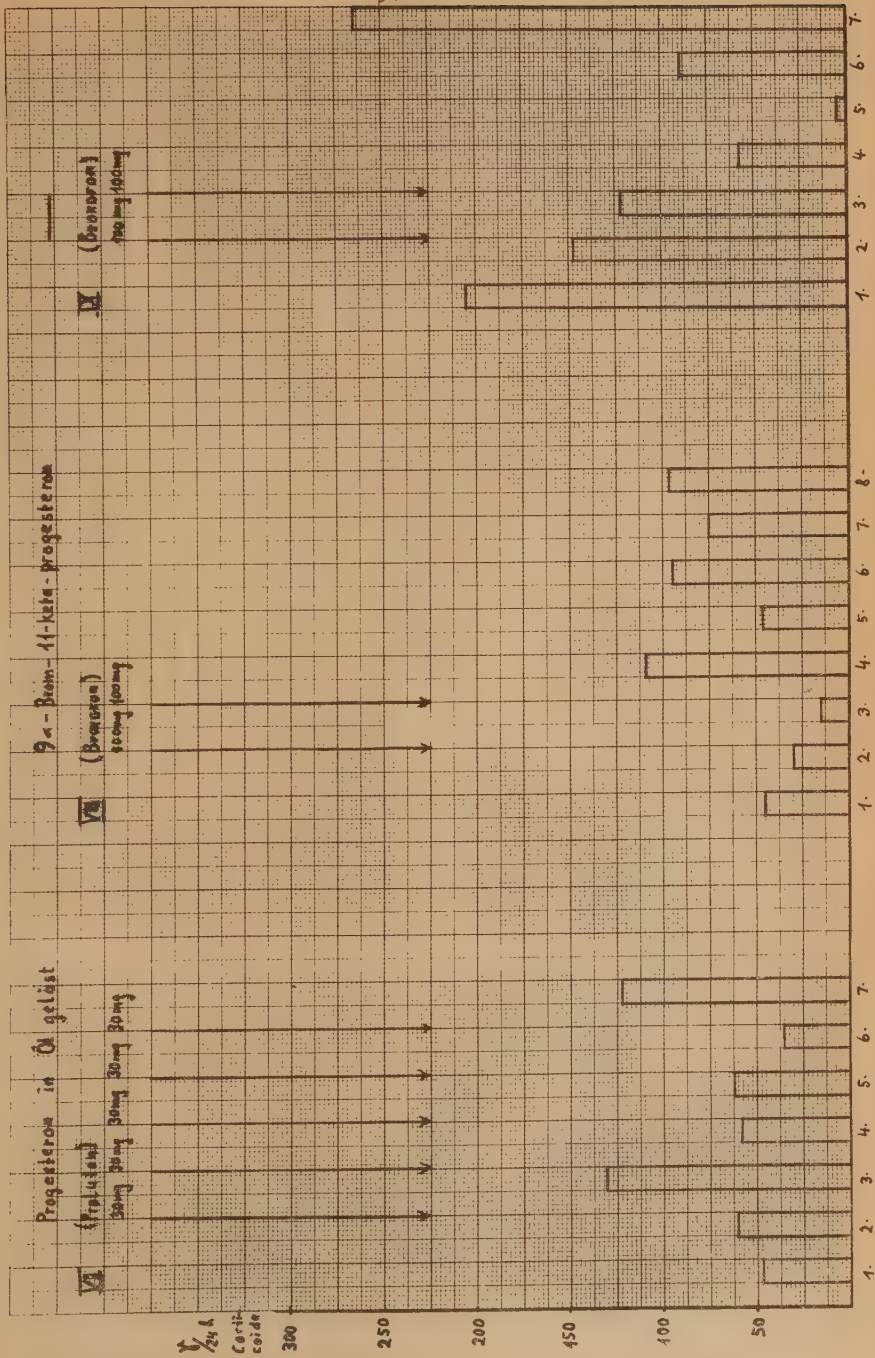
Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	750	0,069	100	
2	1010	0,080	157	
3	1230	0,054	130	← Broxoron 100 mg
4	1010	0,031	61	← Broxoron 100 mg
5	1040	0,056	113	← Broxoron 100 mg
6	1160	0,012	29	← Broxoron 100 mg
7	1070	0,082	170	← Broxoron 100 mg
8	1270	0,045	110	

Fall XIV: Frau Schl. , 66 Jahre, Menopause.

Versuchs- tag	24-h-Urin in ml	Extinktion	Corticoidaus- schdg. in γ	Präparat
1	1050	0,029	60	
2	900	0,034	59	← Broxoron 200 mg
3	900	0,019	33	← Broxoron 200 mg
4	760	0,011	17	← Broxoron 200 mg
5	810	0,094	147	← Broxoron 200 mg
6	1010	0,020	40	







9 α -Brom-11-keto-progesteron

X
(Progesteron)
100 mg 100 mg

$\frac{1}{2}$ 34A
Cortic-
oide

300

250

200

150

100

50

1.

2.

3.

4.

5.

6.

7.

XI
(Progesteron)
100 mg 100 mg 100 mg 100 mg 100 mg

1.

2.

3.

4.

5.

6.

7.

XII

(Progesteron)

100 mg 100 mg 100 mg 100 mg 100 mg 100 mg

1.

2.

3.

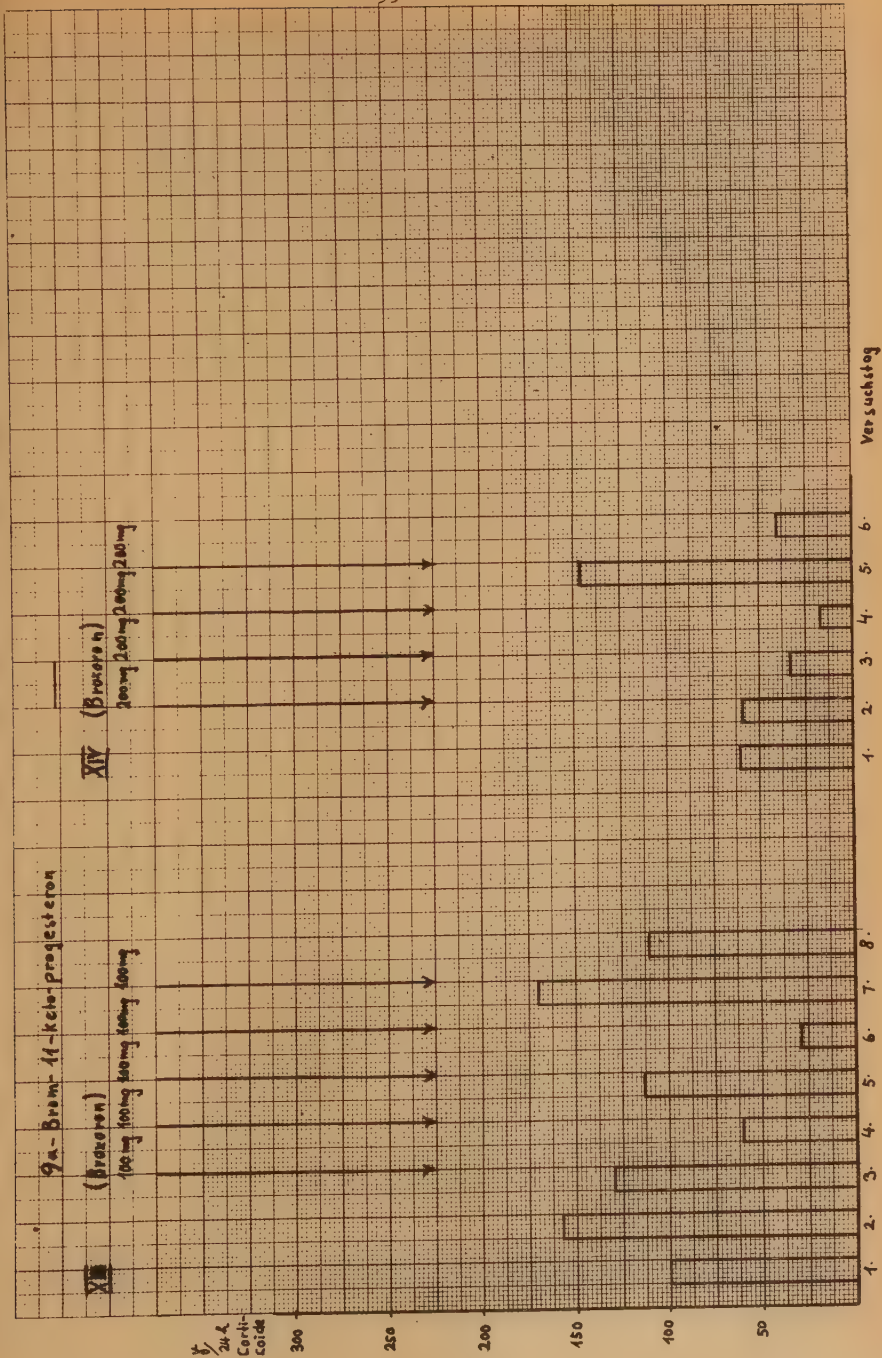
4.

5.

6.

7.

Versuchslos



3. Diskussion der Ergebnisse..

Die Ergebnisse von P i n c u s und Mitarb. (10;17) beweisen, daß die isolierte durchströmte NN Progesteron in höher hydroxylierte Steroide umwandeln kann. Auch die in vivo Versuche von P l o t z (25) am Menschen in der Schwangerschaft und bei M. Cushing sprechen für einen Umbau von Progesteron in Cortisol und Cortison.

Es blieb die Frage offen, ob die NNR des Menschen bei normaler endokriner Ausgangssituation diesen Umbau ebenfalls vollzieht und ob er quantitativ von Bedeutung ist.

Die Bestimmung der freien cortisonartigen Steroide im Urin vor und nach Progesteroninjektion mit der von P o r t e r und S i l b e r (26) angegebenen Methode ermöglichte die quantitative Erfassung der genannten Hormongruppe im Harn und damit eine Aussage zur Fragestellung.

In allen sieben untersuchten Fällen (Fall I bis VII) stieg die Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin nach Progesteroninjektion prompt an, zum Teil auf das fünffache der Ausgangswerte. Der durchschnittliche Anstieg betrug während der ganzen Versuchsdauer 122%. Am ersten Tage nach Injektion von 100 mg Progesteron betrug der Anstieg im Mittel 147%, unabhängig von den Ausgangswerten machte er etwa 100-130% aus. Nach Injektion kleinerer Progesteronmengen erfolgte ein geringerer Anstieg. Diese ohne Ausnahme in sieben Fällen auftretende Steigerung der Corticoidausscheidung unterliegt nur einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,5% (36). Sie ist mit $p=0,004$ (Tafel nach P ä t a u) signifikant und steht im Gegensatz zu Befunden von Z a n d e r (40), der bei einer Kastratin nach Injektion von 200 mg Progesteron keinen Anstieg der Harncorticoide nachweisen konnte. Es ist aber möglich, daß die relativ unspezifische Methode, die Z a n d e r verwendete, einen Anstieg der cortisonartigen Steroide

im Urin nicht deutlich erkennen ließ.

In den vorliegenden Versuchen folgt also auf eine Injektion von Progesteron regelmäßig ein Anstieg dieser Hormongruppe im Urin, der von der injizierten Progesteronmenge abhängig ist. Da sich jede Erhöhung des Corticoid-Blutspiegels nach Cortisoninjektionen in einer vermehrten Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin äußert (4), ist anzunehmen, daß die Injektion von Progesteron zu einer Vermehrung von cortisonartigen Substanzen im Blut führte. Entsprechend den Ergebnissen von P i n c u s (10; 17) und P l o t z (25) kann die Vermehrung der cortisonartigen Substanzen im Blut auf einen Umbau des injizierten Progesterons in diese Stéroide zurückgeführt werden.

In fünf Fällen trat nach Injektion von 100 mg Progesteron in den folgenden 24 Stunden mit geringen Abweichungen eine mittlere Mehrausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin von 113 μ auf. Bei einer täglichen mittleren Produktion von 11,3 mg Cortisol (7) werden im Urin etwa 100 μ freie Porter-Silber-Chromogene ausgeschieden (31;34). Die mittlere Mehrausscheidung von 113 μ (Fall I bis V) würde also größenordnungsmäßig einer Mehrproduktion von etwa 13 mg Cortisol entsprechen.

Da ein Mehrangebot von Progesteron an die NNR allem Anschein nach eine entsprechende Mehrproduktion von NNR-Hormonen zur Folge hat, ist die Hydroxylierung des Progesterons und damit das Ausmaß der Produktion von cortisonartigen Steroiden vermutlich im wesentlichen von der Menge des angebotenen Progesterons abhängig. Damit werden die an der isolierten NN gewonnenen Ergebnisse, wonach ACTH die Hydroxylierung des Progesterons nicht beeinflusst (10), in vivo am Menschen bestätigt.

Für die Versuche kamen Progesteronpräparate als Kristallsuspension mit ca. einwöchiger Wirkung und als ölige Lösung zur Anwendung. Auffälligerweise

verhielten sich innerhalb der Versuchsdauer alle Präparate gleich. Dies hängt vielleicht mit der Speicherung des Progesterons im Körperfett zusammen, die Kaufmann (15) und Plotz (24) beobachteten.

Nach Injektion von Progesteron zeigten sich in den meisten Fällen Schwankungen der Corticoidausscheidung; nach einer anfänglichen Steigerung der Hormonausscheidung folgte ein temporäres Absinken (Fall II, III, IV, VI, VII). Diese Schwankungen können auf das Reglerprinzip zwischen Hypophysen- und NNR-System zurückgeführt werden. Der erhöhte Corticoidspiegel im Blut nach Progesteroninjektion bewirkt eine temporäre Drosselung der ACTH-Produktion in der Hypophyse (28). Diese Drosselung wiederum schränkt die endogene Hormonproduktion in der NNR ein und senkt damit auch den Ausscheidungswert.

Bei Injektion von 30 mg Progesteron täglich wurden nach einer primären Steigerung der Corticoidausscheidung im Urin über drei Tage nur geringe Corticoidmengen ausgeschieden (Fall VII), die etwa die Größe der Ausgangswerte hatten. Bei dieser Tagesdosis, die etwas größer ist als diejenige in der Corpus-luteum-Phase des Cyclus, scheint also nur eine geringe Mehrproduktion von cortisonartigen NNR-Steroiden aufzutreten. Am letzten Tage des Versuches erfolgte aber wieder eine Steigerung der Hormonausscheidung, sodaß gegenüber den Ausgangswerten ein mittlerer Anstieg von 49% resultierte. Offenbar verarbeitet die NNR bei täglicher Injektion von 30 mg nur wenig Progesteron in Corticosteroide, was damit übereinstimmt, daß in der Corpus-luteum-Phase des Cyclus nicht mehr Corticoide ausgeschieden werden als in der Follikelphase (39a). 50 mg Progesteron täglich an zwei Tagen (Fall VI) hatten bereits einen deutlichen treppenförmigen Anstieg der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin zur Folge.

Ein durch die Injektion entstandener Stress kann ausgeschlossen werden, da die Steigerung der Corticoidausscheidung nach Progesteroninjektion mehrere Tage lang auftrat (Fall I, II, III, V) und nicht nach jeder Injektion ein Anstieg der Harncorticoide erfolgte (Fall VII). Gegen eine unspezifische Wirkung spricht auch die Tatsache, daß gleiche Mengen von Progesteron trotz Verwendung verschiedener Applikationsformen einen fast gleichen Anstieg der Corticoidausscheidung bewirkten.

9 α -Brom-11-keto-progesteron erzeugte bei oraler Gabe keine gleichartigen Effekte. In drei von sieben Fällen erfolgte bei Dosierung von 100-200 mg täglich über die ganze Versuchsdauer ein Anstieg der Corticoidausscheidung im Urin zwischen 59 und 92 Prozent gegenüber den Ausgangswerten (Fall VIII, X, XI). Die übrigen vier Fälle (Fall IX, XII, XIII, XIV) lassen eine Depression um 3 bis 39 Prozent erkennen.

Am ersten Tage nach der Applikation von 9 α -Brom-11-keto-progesteron zeigte sich in sechs von sieben Fällen (Fall VIII, IX, X, XII, XIII, XIV) eine Depression der Corticoidausscheidung zwischen 18 und 61 Prozent, im Mittel um 40%. Hierfür sind folgende Erklärungsmöglichkeiten denkbar:

1. Eine Beeinflussung der Nierenfunktion.
2. Eine Senkung des Corticoid-Blutspiegels.

Eine nephrogene Retention von Corticoiden ist bisher nicht beschrieben worden. Senkungen des Blutspiegels der Corticoide können durch vermehrten Abbau oder verminderte Produktion der Hormone entstehen. Die Verminderung der Produktion wiederum kann durch direkten Eingriff der Substanz in die Synthese oder durch Hemmung der ACTH-Produktion in der Hypophyse bedingt sein. Verschiedene synthetische Steroide, die gestagene Eigenschaften haben, senken die Ausscheidung der Corticoide. B r i c h a n t und Mitarb. (3) untersuchten das 17-Äthyl-19-nor-testosteron

Diese Substanz senkte die Urin- und Plasmawerte der 17-Hydroxycorticoide; der durch Cortisol-Injektion künstlich erhöhte Corticoidspiegel im Blut sowie die erhöhte Ausscheidung der NNR-Hormone nach ACTH-Injektion wurden nicht beeinflusst. Daher nehmen die Autoren eine Hemmung der adrenocorticotropen Funktion des HVL an. K a i s e r (13) beschreibt eine solche Hemmung durch Äthinylnortestosteronacetat. Da 9 α -Brom-11-keto-progesteron nach L i p s c h u t z und Mitarb. (18) eine starke antiluteinisierende Wirkung auf das Milzovar den Meerschweinchens ausübt, ist mit einer Beeinflussung des HVL zu rechnen. Möglicherweise liegt also bei der beobachteten Depression der Corticoidausscheidung durch 9 α -Brom-11-keto-progesteron eine kurze Hemmung der adrenocorticotropen Funktion des HVL vor. Die Ergebnisse unterliegen bei einem abweichenden Resultat unter sieben Fällen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von etwa 2,5% (36).

Über die ganze Versuchsdauer ist die Verringerung der Corticoidausscheidung nur in vier Fällen nachweisbar, sie beträgt im Mittel 22%. Offensichtlich ist also der Einfluß des 9 α -Brom-11-keto-progesterons auf die adrenocorticotrope Funktion des HVL nur gering oder garnicht vorhanden.

In drei von sieben Fällen (Fall VIII, X, XI) erfolgte nach Verabreichung von 9 α -Brom-11-keto-progesteron ein Anstieg der Corticoidausscheidung im Urin um 59-92 Prozent. Dieser könnte mit einem Umbau der Substanz in freie Porter-Silber-Chromogene erklärt werden. Es wäre denkbar, daß durch Hydroxylierung an C₁₇ und C₂₁ ein 9 α -Brom-cortison entsteht, das eine positive Porter-Silber-Reaktion ergeben könnte. P i n c u s (17) und S a m u e l s (23) machten die Beobachtung, daß Steroide mit einem Sauerstoffatom an C₁₁ durch die NNR nicht weiter hydroxyliert werden können. Nach W e t t s t e i n (37) besteht diese Blockierung aber nur bedingt. Ein relativer Fermentblock würde die im Vergleich zu Progesteron nur unwesentliche bzw. nicht nachweisbare Umwandlung des 9 α -Brom-11-keto-progesterons

in cortisonartige Steroide erklären. Bisher weiß man jedoch überhaupt noch nicht, ob das Brom-Atom an C₉ auch einen Einfluß auf die Hydroxylierung hat, der Stoffwechsel des 9 α -Brom-11-keto-progesterons ist noch ungeklärt. Untersuchungen über die Pregnandiolausscheidung (nach einem Vorschlag von Professor D a n n e n b e r g) ergaben nach oraler Verabreichung von 300 mg des Steroids nur Spuren von nicht sicher mit Pregnandiol identischen Pregnanverbindungen. Demgegenüber werden 80-100 mg Progesteron innerhalb von fünf Tagen zu 10-20 Prozent als Pregnandiol im Urin ausgeschieden (11; 12), sodaß mit Sicherheit angenommen werden kann, daß 9 α -Brom-11-keto-progesteron nicht in Pregnandiol umgebaut wird.

Der unterschiedliche Effekt des 9 α -Brom-11-keto-progesterons auf die Ausscheidung der freien Porter-Silber-Chromogene im Urin wird am ehesten mit physiologischen Schwankungen erklärt werden können.

4. Zusammenfassung.

Bei 14 Frauen in der Menopause oder nach Ausschaltung der Ovarialfunktion wurde die Ausscheidung der freien cortisonartigen Porter-Silber-Chromogene im Urin

- a) nach Injektion von Progesteron (7 Fälle) und
- b) nach oraler Gabe von 9 α -Brom-11-keto-progesteron (7 Fälle)

untersucht.

Nach Injektion von Progesteron erfolgte in allen Fällen in den nächsten 24 Stunden ein Anstieg der Porter-Silber-Chromogene im Urin um durchschnittlich 147%, während der ganzen Beobachtungsdauer post inj. betrug er durchschnittlich 122%. Die Ergebnisse sind trotz der unterschiedlichen Ausgangswerte für den 1. Tag post inj. mit $p=0,004$ signifikant (Tafel nach P ä t a u). Die vermehrte Ausscheidung der Porter-Silber-Chromogene im Urin wird auf einen Umbau des Progesterons in cortisonartige Steroide zurückgeführt.

Progesteronpräparate als Kristallsuspension und als ölige Lösung zeigten ein gleichartiges Verhalten.

Stärkere Tagesschwankungen der Corticoidausscheidung werden als Ausdruck des Reglerprinzips zwischen Hypophysen- und NNR-System aufgefaßt.

Nach oraler Gabe von 9 α -Brom-11-keto-progesteron zeigte sich in 6 von 7 Fällen am ersten Tage eine Depression der Corticoidausscheidung um durchschnittlich 40%. Sie kann mit einer schwachen momentanen Hemmwirkung der Substanz auf die adrenocorticotrope Funktion des HVL erklärt werden. Das während der ganzen Versuchsdauer jedoch vorhandene differente Verhalten der Corticoidausscheidung läßt erkennen, daß das 9 α -Brom-11-keto-progesteron mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in Corticoide umgewandelt wird. Ob dafür die Halogenierung oder die Ketogruppe verantwortlich

ist, ist noch unklar. Die Substanz wird im Gegensatz zu Progesteron auch nicht in Pregnandiol umgewandelt.

Eine signifikante Veränderung der Harnvolumina ist weder nach Progesteron noch nach 9 α -Brom-11-keto-progesteron zu erkennen.

Literaturverzeichnis.

1. Barry , M.C., M.L. Eiddinoff , K. Dobriner ,
T.F. Gallagher : *Endocrinology* 50, 587 (1952)
2. Bloch ,K.: *J.of Biol.Chem.* 157, 661 (1945)
3. Brichant , J., M.L. Brichant , E. Engel ,
A.M. Riondel : *Schweiz.med. Wschr.* 88,236 (1958)
4. Burton ,R.B., E.H. Keutmann , C.
Waterhouse , E.A. Schuler : *J.of Clin.*
Endocrin.a.Metabol. 13,48 (1953)
5. Burton , R.B., A. Zaffaroni , E.H. Keutman
J.of Biol.Chem. 193, 769 (1951)
6. Bush , I.E., M. Willoughby :
Biochem. Journal 67, 689 (1957)
7. Cope , C.L., E.G. Black : *Clin.Science*,17, 147 (1958)
8. Dorfman ,R.J.: *Ciba Foundation Colloquia on*
*Endocrin.*Bd. II,291 (London 1952)
9. Hellmann , L., H.L. Bradlow , I. Adesman ,
D.K. Fukushima , J.L. Kulp , T.F.Gallagher
J.Clin.Invest. 33,1106 (1954)
10. Jacobsen ,R.P., G. Pincus :
Amer.J.Med. 10, 531 (1951)
11. Kaiser ,R.: *Klin. Wschr.* 32, 495 (1954)
12. Kaiser ,R.: *Klin. Wschr.* 33, 15 (1955)
13. Kaiser ,R.: *Klin. Wschr.* 37, 1045 (1959)
14. Kaiser ,R.: *Gebh. u. Frauenhk.* 17,24 (1957)
15. Kaufmann , C., J. Zander : *Klin.Wschr.* 34,7 (1956)
16. Labhart , A., D. Jenkins , P.H. Forsham :
Schweiz. Med. Wschr. 82, 877 (1952)
17. Levy , Jeanloz , Hechter , Schenker ,
Pincus : *J.of Biol.Chem.* 211,867 (1954)
18. Lipschutz , A., S. Figueroa :
Acta Endocrinol. 26, 371 (1957)
19. Long , C.N.H.: *Rec.Progr.in Horm.Res.* 7, 75 (1952)
20. Pfeffer , K.H., W. Ruppel , H.J. Staudinger
L. Weissbecker : *Arch.f.exp.Path.u.Pharm.*214,165(1955)
21. Pfeffer , K.H., H.J. Staudinger :
Klin.Wschr. 29, 201 (1951)
22. Pfeffer , K.H., H.J. Staudinger :
Angew.Chemie 63, 321 (1951)

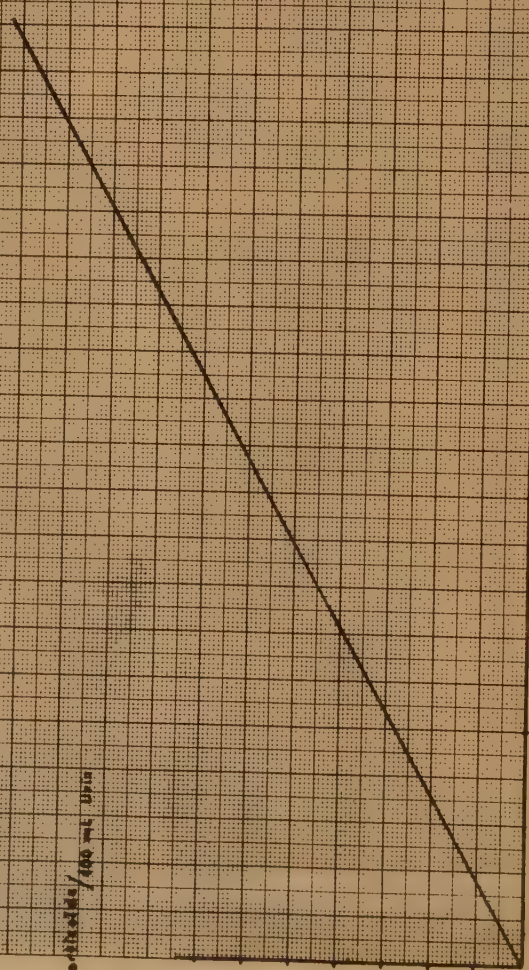
3. P l a g e r, J.E., L.T. S a m u e l s :
J.of Biol.Chem. 211,21 (1954)
4. P l o t z , J.: Mitteilung auf dem Endokrin.-Kongress
Kiel 1959
5. P l o t z , J.: Geburtsh. u. Frauenhk. 17, 595 (1957)
6. P o r t e r , C.C., R.H. S i l b e r :
J.of Biol.Chem. 185, 201 (1950)
7. R o m a n o f f , L.P., J. S e e l y e , R. R o a r i g u e n .
G. P i n c u s : J.of Clin.Endocrin.a.Metabol.17, 434 (1957)
8. S a y e r s , G., M.A. S a y e r s :
Rec.Progr.in Hormon Res. 2, 81 (1948)
9. S e l y e , H.: Einführung in die Lehre vom Adaptations-
syndrom (Thieme-Verlag 1953)
0. S c h n e i d e r , J.J.: J.of Biol.Chem. 183, 365 (1950)
1. S c h r e i e r , K., K. K a d e l i s , T. F a r s k a :
Klin.Wschr. 30, 657 (1952)
2. S t a u d i n g e r , H.J., M. S c h m e i s s e r :
Biochem. Zschr. 321, 83 (1950)
3. S t a u d i n g e r , H.J., M. S c h m e i s s e r :
Zschr.f.Physiol.Chem. 283, 54 (1948)
4. S t u h l f a u t h , K., R. P r o s i e g e l ,
A. E n g e l h a r d t - G ö l k e l :
Klin.Wschr.32, 676 (1954)
5. V e r z á r , F.: Schweiz.Med.Wschr.80, 468 (1950)
6. v a n d e W a e r d e n :
Mathem. Statistik (Springer-Verlag1958)
7. W e t t s t e i n , A.: Mitteilung auf dem IV intern. Kongress
f. Biochemie Wien 1958
8. W e t t s t e i n , A., G. A n n e r :
Experientia 10, 397 (1954)
9. W i e s t : in Z a n d e r , J.:Gebh.u.Frauenhk. 17, 876 (1957)
0. Z a n d e r , J.: Klin.Wschr. 31, 504 (1953)
1. Z a n d e r , J.: Gebh.u.Frauenhk. 17, 876 (1957)
2. Z i m m e r m a n n , W.: Arzneimittelforsch. 1, 396 (1951)
3. Z i m m e r m a n n , W.: Chemische Bestimmungsmethoden
von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten.
Springer-Verlag 1955.
- 9a. W ü r t e r l e , A., W. S c h m i d t :
Zentralbl. f. Gyn. 81, 1389 (1959)

Eichkurve für Porter-Silber-Chromogene.

Contholden / 100 ml Dm

g

35
30
25
20
15
10
5



Extinktion
0,100
0,200
0,300
0,400

An dieser Stelle möchte ich Herrn Privatdozent Dr. med. R. K a i s e r für die Überlassung des Themas und die freundliche Anleitung bei der Durchführung der Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. med. W. B i c k e n b a c h danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Untersuchungen durchzuführen.

Nicht zuletzt danke ich auch Fräulein Rogowski für die freundliche Anleitung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Lebenslauf.

Am 17. 9. 1935 wurde ich als Sohn des Dipl. Ing. Rudolf Friedburg und seiner Frau Erna, geb. Windrath, in Hamburg geboren.

Nach 3 Volksschuljahren besuchte ich von 1946 bis 1955 die Sachsenwald-Oberschule in Reinbek.

Während der vorklinischen Semester studierte ich in Hamburg, München und Freiburg, wo ich im Sommer 1957 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Im folgenden Semester studierte ich in Innsbruck und kehrte danach nach München zurück. Hier beendete ich mein Studium und legte im Herbst 1960 die ärztliche Prüfung ab.

